

## Depth-resolving total reflection fluorometry apparatus has condenser of microscope replaced by angularly dispersive element, focussing system and prism

Patent Number: DE19923563

Publication date: 2000-12-07

Inventor(s): SCHNECKENBURGER HERBERT (DE); STRAUS WOLFGANG S L (DE); SAILER REINHARD (DE); STEINER RUDOLF (DE); STOCK KARL (DE)

Applicant(s): STIFTUNG FUER LASERTECHNOLOGIE (DE)

Requested Patent: ☐ DE19923563

Application Number: DE19991023563 19990521

Priority Number (s): DE19991023563 19990521

IPC Classification: G01N21/64; G01J3/42

EC Classification: G01N21/64, G02B21/08B1

Equivalents:

### Abstract

A light spot is focussed on an angularly dispersive element via a hemispherical or semi-cylindrical glass or quartz prism (3), and a predetermined region of the sample (1) is illuminated at different angles. The angularly dispersive element is an adjustable reflector (4). The focussing optical system is a concave mirror (5). The angularly dispersive element, the focussing optical system and the prism are in combination used to replace the condenser of a microscope.

Data supplied from the esp@cenet database - I2





⑬ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 23 563 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 01 N 21/64**  
G 01 J 3/42

②① Aktenzeichen: 199 23 563.5  
②② Anmeldetag: 21. 5. 1999  
④③ Offenlegungstag: 7. 12. 2000

**DE 199 23 563 A 1**

⑦① **Anmelder:**

Stiftung für Lasertechnologien in der Medizin und  
Meßtechnik an der Universität Ulm, 89081 Ulm, DE

⑦② **Erfinder:**

Stock, Karl, 73479 Ellwangen, DE;  
Schneckenburger, Herbert, Dr., 73431 Aalen, DE;  
Sailer, Reinhard, 89073 Ulm, DE; Strauß, Wolfgang  
S.L., 89077 Ulm, DE; Steiner, Rudolf, Dr., 89081 Ulm,  
DE

⑤⑥ **Entgegenhaltungen:**

DE 42 28 366 A1  
DE 41 57 008 A1

Photochemistry and Photobiology, 67, 1998,  
S.363-369;  
Eur Biophys J, 28, 1999, S.91-101;  
Sonderdruck aus: Zeiss Informationen Nr.81,  
Impressum S41-820.1-d MA XII/72 Uooo;  
Rev. Sci. Instrum., 59, 1988, S.588-590;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ **Vorrichtung zur tiefenauflösenden Totalreflexionsfluorometrie mikroskopischer Proben**

⑤⑦ Eine Vorrichtung zur tiefenauflösenden Totalreflexionsfluorometrie mikroskopischer Proben wird beschrieben. Bei solchen Vorrichtungen wird ein vorgegebener Probenbereich unter variablem Winkel beleuchtet. Das bei der Totalreflexion austretende evaneszente elektromagnetische Feld dringt dabei in unterschiedliche Tiefen der Probe ein und kann dort Moleküle zur Fluoreszenz anregen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung stellt eine kompakte Beleuchtungseinheit dar, bei der ein Lichtpunkt auf einem winkeldispersiven Element über ein hemisphärisches oder hemizylindrisches Prisma auf die Probe abgebildet wird. In die Beleuchtungseinheit kann Licht beliebiger Lichtquellen vom nahen ultravioletten bis zum nahen infraroten Spektralbereich über Multimode- oder Monomodefasern eingekoppelt werden.

**DE 199 23 563 A 1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur tiefenauflösenden Totalreflexionsfluorometrie im Grenzflächenbereich mikroskopischer Proben gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Totalreflexionsfluorometrie ist ein Meßverfahren, bei dem ein aus einem optischen Medium 1 kommender Lichtstrahl an der Grenzfläche zu einem optischen Medium 2 total reflektiert wird. Hierbei dringt ein evaneszentes elektromagnetische Feld in das Medium 2 ein und regt grenzflächennahe Moleküle einer Probe zur Fluoreszenz an. Diese Fluoreszenz wird mit einem Mikroskopobjektiv detektiert. Die Eindringtiefe des evaneszenten elektromagnetischen Feldes ändert sich mit dem Winkel des eingestrahlt Lichts, so daß Moleküle in unterschiedlicher Tiefe der Probe zur Fluoreszenz angeregt werden können (D. Axelrod, J. Cell Biol. 89: 141-145, 1981; J. S. Burmeister et al., J. Microsc. 173: 39-51, 1994). In der Zellbiologie handelt es sich hierbei um Fluorophore (z. B. Stoffwechselindikatoren, Tumormarker) aus dem Extrazellularraum, der Zytoplasmamembran, sowie den angrenzenden Bereichen des Zytoplasmas. Eine Auswertemethode zur tiefenauflösenden Totalreflexionsfluorometrie ist von B. P. Ölveczky et al. (Biophys. J. 73: 2836-2847, 1997) beschrieben.

Als Vorrichtungen zur Totalreflexionsfluorometrie sind bekannt:

1. mikroskopische Aufbauten mit einem hochaperturigen Objektiv und ringförmiger Beleuchtung der Proben, wobei der Einstrahlwinkel größer ist als der Grenzwinkel der Totalreflexion (A. L. Staout and D. Axelrod, Appl. Opt. 28: 5237-5242, 1989). Hierbei ist jedoch keine Variation des Einstrahlwinkels und damit keine Tiefenauflösung möglich;
2. Aufbauten, bei denen ein Laserstrahl an der Oberfläche eines Glasprismas mit rechteckigem oder trapezförmigem Querschnitt total reflektiert wird, wie u. a. von W. S. L. Strauss et al. beschrieben (Photochem. Photobiol. 67: 363-369, 1998). Hierbei verschiebt sich der Auftreffpunkt des Lichts auf die Probe bei Veränderung des Einstrahlwinkels, so daß die Tiefenauflösung an einem vorgegebenen Probenbereich nicht möglich ist;
3. ein Scanning-Aufbau mit mehreren rotierenden Spiegeln und Platten (B. P. Ölveczky et al., Biophys. J. 73: 2836-2847, 1997). Dieser Aufbau ist jedoch äußerst aufwendig, weil zwei Spiegel und eine transparente Platte gleichzeitig bewegt werden müssen, um den Auftreffpunkt des Laserstrahls auf der Probe bei Veränderung des Einstrahlwinkels konstant zu halten
4. ein Aufbau, bei dem ein Laserstrahl über ein hemizylindrisches Prisma auf die Probe abgebildet wird, und der somit eine Tiefenauflösung vorgegebener Probenbereiche erlaubt (M. Oheim et al., Eur. Biophys. J. 28: 91-101, 1999). Auch dieser Aufbau ist sehr komplex. Darüber hinaus ist er mit chromatischen Aberrationen, bedingt durch die abbildenden Linsen behaftet. Außerdem sind diese Linsen nicht für jede interessierende Wellenlänge geeignet.

Im Gegensatz hierzu liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung zur tiefenauflösenden Totalreflexionsfluorometrie im Grenzflächenbereich mikroskopischer Proben bei vorgegebenem Probenbereich zu schaffen, die eine kompakte Einheit bildet, an ein vorhandenes Mikroskop ansetzbar ist und die Einstrahlung über den gesamten durch die Totalreflexion bedingten Winkelbereich ermög-

licht. Diese Aufgabe wird durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Mittel gelöst. Dadurch, daß als winkeldispersives Element ein einstellbarer Spiegel und als Abbildungsoptik ein Hohlspiegel verwendet wird, ist die Einstrahlung von Licht beliebiger Wellenlänge möglich, ohne daß die störende chromatische Aberration oder unterschiedliche Absorption des Lichts in Linsen auftreten. Gleichzeitig ergibt sich der Vorteil eines kompakten Aufbaus durch Faltung des Strahlengangs. Gegenüber der Verwendung eines akustooptischen Modulators (B. P. Ölveczky et al., Biophys. J. 73: 2836-2847, 1997; M. Oheim et al., Eur. Biophys. J. 28: 91-101, 1999) bleibt beim einstellbaren Spiegel die Strahlqualität des eingestrahlt Lichts erhalten.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung wird anhand der Figur näher erläutert. Die Probe 1 (Zellmonolayer) befindet sich in Kontakt zum Objektträger 2, der gemeinsam mit dem Glasprisma 3 einen Halbzylinder bildet. Objektträger und Glasprisma sind durch eine dünne Schicht einer Immersionsflüssigkeit optisch gekoppelt. Als winkeldispersives Element dient der einstellbare Spiegel 4, von dem ein Lichtpunkt mit dem Hohlspiegel 5 über die Strahlumlenkung 6 auf die im Zentrum des Halbzylinders liegende Probe 1 abgebildet wird. Diese Anordnung erlaubt, einen vorgegebenen Bereich der Probe 1 unter unterschiedlichen Winkeln zu beleuchten. Ist der Beleuchtungswinkel größer als der Grenzwinkel der Totalreflexion, so wird der Lichtstrahl total reflektiert und in der Strahlfalle 7 absorbiert. Die durch das evaneszente elektromagnetische Feld in der Probe 1 angeregte Fluoreszenzstrahlung wird mit dem Mikroskopobjektiv 8 aufgenommen und anschließend räumlich, spektral und/oder zeitlich aufgelöst erfaßt. Der Einstrahlwinkel und damit die Eindringtiefe des evaneszenten elektromagnetischen Feldes wird durch die Stellung des einstellbaren Spiegels 4 bestimmt. Dies erfolgt über den Schrittmotor 9 und die aufgesetzte Kulisse 10. Im Ausführungsbeispiel handelt es sich hierbei um einen schräg geschnittenen Zylinder, der beim Umlauf des Schrittmotors über einen Hebel 11 einen sinusförmigen Vorschub des einstellbaren Spiegels verursacht. Durch Positionierung des Schrittmotors über einen angeschlossenen Rechner kann dieser Spiegel und damit der Einstrahlwinkel eingestellt werden. Durch diese Ausgestaltung des Spiegelstelltriebs wird ermöglicht, daß der Spiegel nicht über den Winkelbereich der Totalreflexion hinaus bewegt werden muß.

Die Einkopplung des Lichts der Lichtquelle 12 (Spektrallampe oder Laser) erfolgt über eine Multimode- oder Monomodefaser 13, sowie eine daran angepaßte Kollimatorlinse 14, deren hinterer Brennpunkt am Laserende liegt. Das eingekoppelte Licht fällt somit als Parallelstrahl auf den einstellbaren Spiegel. Faserende und Kollimatorlinse sind in einen Adapter 15 integriert. Hierfür bietet die Beleuchtungseinheit eine zentrierbare Aufnahme, die die Einkopplung zahlreicher Lichtquellen im sichtbaren, nahen ultravioletten oder nahen infraroten Spektralbereich erlaubt. Bedingt durch die geringe Anzahl der notwendigen Komponenten und die Faltung des Strahlengangs läßt sich die Beleuchtungseinheit derart verkleinern, daß sie anstelle eines Kondensors an ein Mikroskop ansetzbar ist.

## Patentansprüche

1. Vorrichtung zur tiefenauflösenden Totalreflexionsfluorometrie im Grenzflächenbereich mikroskopischer Proben, bei der ein Lichtpunkt auf einem winkeldispersiven Element über ein hemisphärisches oder hemizylindrisches Glas- oder Quarzprisma abgebildet wird, und ein vorgegebener Probenbereich unter verschiedenen Winkeln beleuchtet wird, dadurch gekennzeich-

net, daß das winkeldispersive Element ein einstellbarer Spiegel ist, die Abbildungsoptik ein Hohlspiegel ist, und daß winkeldispersives Element, Abbildungsoptik und hemisphärisches oder hemizylindrisches Prisma zusammen anstelle eines Kondensors an ein Mikroskop 5 angesetzt sind.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß ein hemisphärisches Prisma vorgesehen ist, das beim Einstellvorgang des Probenbereichs mit Durchlichtmikroskopie für die Beleuchtung verwendet 10 wird.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß der einstellbare Spiegel in seinem Drehwinkel in einem durch den Winkelbereich der Totalreflexion vorgegebenen Bereich einstellbar ist. 15

4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß als Lichtquelle Laser oder Spektrallampen in einem Spektralbereich vom nahen Ultraviolett bis zum nahen Infrarot verwendbar sind. 20

5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß die Lichteinkopplung über eine Monomode- oder eine Multimodefaser mit jeweils daran angepaßter Kondensorlinse erfolgt. 25

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

30

35

40

45

50

55

60

65

